



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 103 38 123 B3 2005.07.28

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: 103 38 123.6
(22) Anmeldetag: 15.08.2003
(43) Offenlegungstag: –
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 28.07.2005

(51) Int Cl.⁷: C12Q 1/68

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden.

(71) Patentinhaber:
Scanbec GmbH, 06120 Halle, DE

(74) Vertreter:
Pauling, H., Dipl.-Wirts.-Ing.(FH)Pat.-Ing.Dipl.-Jur.,
Pat.-Anw., 08124 Halle

(72) Erfinder:
Breitenstein, Antje, Dr., 06114 Halle, DE;
Rosilainen, Tarja, Oulu, FI; Neubauer, Dieter, Prof.
Dr., Oulu, FI

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
DE 195 15 891 A1
US 55 69 586 A
Rautio, J. u.a.: Sandwich hybridisation assay for
quantitative detection of yeast RNAs in crude cell
lysates. Microb. Cell Fact. (28.04.03) 2(1)4,
S. 1-9;

(54) Bezeichnung: Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella

(57) Hauptanspruch: Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella mittels der Sandwich-Hybridisierungsmethode dadurch gekennzeichnet, dass

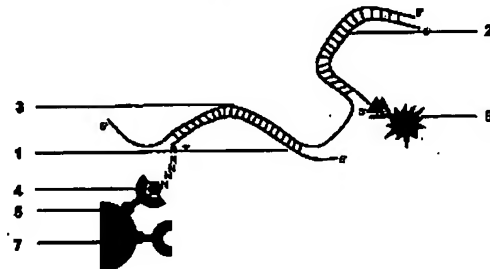
a) gattungsspezifisch zum Nachweis der Gattung Legionella als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CACTGTATGT-CAAGGGTAGG,

b) artspezifisch zum Nachweis von Legionella pneumophila als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATCT-GACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TTCGCCGCCCTCTG-TATCG-3';

e) artspezifisch zum Nachweis von Legionella feeleii als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GCGC-CACTAACCTCATTCAT-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TATACAACCACCTACG-CACC-3' und

d) artspezifisch zum Nachweis von Legionella jordanii als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCATCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CTTACGGTC-CCCAGCTTTTT-3';

verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von 50–55° C erfolgt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* mittels der Sandwich-Hybridisierungs-Methode.

Stand der Technik

[0002] *Legionella* spp. sind gram-negative, stäbchenförmige und fakultative intrazelluläre Pathogene. Es werden mehr als 42 Spezies mit 64 Sero-Gruppen unterschieden.

[0003] Sie werden als intrazelluläre Parasiten von Amöben und Ciliaten normalerweise in wässriger Umgebung sowie in nassen Boden gefunden. Sie werden auch in oder an künstlich hergestellten Plätzen oder Produkten wie Kühltürmen, klinischen Beatmungsgeräten, Whirlpools oder Duschen gefunden.

[0004] Der Mensch infiziert sich mit Legionellen nach dem Einatmen kontaminierter Aerosol- oder Tropfen aus den oben erwähnten Habitaten. In der Lunge fallen die *Legionella*-Bakterien Makrophagen und können eine Form der Lungenentzündung verursachen, bekannt als Legionärs-Krankheit. Die Symptome beginnen mit schwachen Husten, Unwohlsein, Muskelschmerzen, leichtem Fieber, sowie gastrointestinalen Störungen und steigern sich zu hohem Fieber, Alveolitis und Bronchitis. *Legionella pneumophila* ist der wichtigste Erreger für die Legionellose, aber auch andere Spezies der Gattung *L.* kommen als Krankheitserreger beim Menschen in Frage.

[0005] Zum Nachweis der *Legionella*-Spezies in Wasserproben sind aus der Literatur die Kultivierungs-Methode, auf Polymerase-Kettenreaktionen beruhende Methode sowie die Verwendung monoklonaler Antikörper bekannt. Angewendet wird die Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Sonden.

[0006] Aus der DE 195 15 891 A1 ist auch ein Verfahren zur Amplifizierung von Nukleinsäuren der Gattung *Legionella* bekannt. Dieses Verfahren verwendet nicht die Sandwich-Hybridisierungs-Methode.

[0007] Weiter wurde aus der US 5.569.586 A die Anwendung der Sandwich-Hybridisierung-Methode bekannt. Diese Methode basiert auf der Nutzung von zwei Oligonukleotid-Sonden einer Fänger-Sonde und einer Nachweis-Sonde. Die Fänger-Sonde ist kovalent an einen festen Untergrund gebunden. Zunächst hybridisiert die zu untersuchende Ziel-Nukleinsäure bei spezifischen Temperaturen mit den beiden Sonden. Danach bindet die Ziel-Nukleinsäure und der Sondenkomplex an den festen Untergrund der Fänger-Sonde. Der Nachweis kann mit Fluoreszenz oder Chemilumineszenz, Farbreaktionen oder radioaktiven Markierungen erfolgen. Aus der Veröffentlichung Rautio et al: Sandwich hybridisation assay for quantitative detection of yeast RNA s in crude cell lysates. Microb. Cell Fact. (28.04.2003 2 (1)4, S. 1-19), ist weiter ein Sandwich-Hybridisierungs-Assay für Hefen bekannt.

[0008] Wichtig für den Erfolg dieser Methoden sind die Eigenschaften der Sonden für die jeweilige spezifische Hybridisierung. Das wird durch den bisherigen Stand der Technik nur teilweise gewährleistet.

Aufgabenstellung

[0009] Die Aufgabe der Erfindung besteht deshalb darin, neue gattungs- und artspezifische Oligonukleotide zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* herzustellen und zu verwenden.

[0010] Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß

- a) zum Nachweis der gesamten Gattung *Legionella* als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CACTGTATGTCAAGGGTAGG;
- b) zum Nachweis von *Legionella pneumophila* als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TTCGCCGC-CCTCTGTATCG-3';
- c) zum Nachweis von *Legionella feeleii* als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GCGC-CACTAACCTCATTTCAT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TATACAAC-CACCTACGCACC-3' und
- d) zum Nachweis von *Legionella jordanis* als Fänger-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCACTCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweis-Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CT-TACGGTCCCCAGCTTTT-3' verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von fünfzig bis

fünfundfünfzig Grad Celsius erfolgt.

[0011] Die wichtigsten Daten der neuen Oligonukleotid-Sonden sind in nachfolgender Tabelle 1 dargestellt.

Name der Sonde	Sequenz	Ziel-Spezies	Position In E.coli 16SrRNA	Sonde in der Sandwich-Hybridisierung	Spezifische Hybridisierungs-Temp.
legpneu 1	5'-TTCGCCGCCCTCTGTATCG-3'	L.	575-594	Nachweis	50°C
legpneu 2	5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3'	pneumo-phila	626-643	Fänger	
legfeel 1	5'-GCGCCACTAACCTCATT CAT-3'	L.	840-859	Fänger	55°C
legfeel 2	5'-TATACAACCACCTACGCACC-3'	feel	575-594	Nachweis	
legjor 1	5'-CTTACGGTCCCCAGCTTTT-3'	L.	192-211	Nachweis	55°C
legjor 2	5'-CCACTCCTCCCCACTGAAAG-3'	jordanis	435-454	Fänger	
legall 11	5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3'	Genus	433-451	Fänger	
legall 22	5'-CACTGTATGTCAAGGGTAGG	legionella	983-1001	Nachweis	50°C

[0012] Bei artspezifischen Nachweisen von Legionella-Spezies sind gemäß Patentanspruch 2 die Oligonukleotide für Fänger-Sonden und Nachweis-Sonden gegeneinander austauschbar.

[0013] Weiterhin werden die Nachweise von Bakterien der Gattung Legionella gemäß Patentanspruch 3 mit Kombinationen von Oligonukleotiden für gattungsspezifische Sonden und Oligonukleotiden für artspezifische Sonden vorgenommen.

[0014] Von Vorteil ist weiter, daß die neuen gattungs- und artspezifischen Oligonukleotid-Sonden alle für eine Hybridisierung bei Temperaturen von 50–55°C entwickelt wurden. Damit sind Kombinationen von mehr als 2 Sonden möglich, welche die Voraussetzung für den Nachweis von mehr als 1 Legionella -Spezies in einem Test sind. Hierzu werden magnetische Beads mit verschiedenen zum Nachweis von einzelnen Legionella-Spezies Fänger-Sonden gemischt (Multiplex-Analyse) beispielsweise Fänger-Sonden zum Nachweis von L. p. mit Fänger-Sonden zum Nachweis von L. f. oder anderen in Kombination mit einer gattungsspezifischen Nachweis-Sonde.

Ausführungsbeispiel

[0015] Das erfindungsgemäße Verfahren wird im folgenden unter Hinweis auf die beigefügte Zeichnung näher erläutert.

[0016] Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Sandwich-Hybridisierungs- Methode.

[0017] Dabei ist die Fänger-Sonde 1 mit Biotin 4 markiert; bindet an mit Streptavidin 5 ummantelte magnetische Kugeln (magnetic beads) 7. Nach erfolgter Hybridisierung der Ziel-Nukleinsäure mit den beiden Sonden 1 und 2 geschieht der Nachweis mit Alkalischer Phosphatase 6 die an die Digoxigeninmarkierte Nachweissonde 2 über Anti DIG Fab Fragment bindet. der Nachweis des amplifizierten Fluoreszenz- Signals kann durch ein

Fluoreszenz- Lesegerät quantifiziert werden. Eine weitere Nachweismöglichkeit ist die Erfassung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase durch elektrochemische Sensoren.

[0018] Zur Probenaufbereitung werden Gesamt- DNA -Proben verschiedener Legionella- Spezies verwendet. Die 16S ribosomale DNA (rDNA) wurde aus der gesamten DNA verschiedener Legionella- Spezies unter Verwendung der fD1 und rP2- Universal- Primer für die 16SrDNA mittels PCR amplifiziert. Der Promoter- Bereich der T7 Polymerase war im fD1 enthalten. In vitro transkribierte 16SrRNA wurde von den entsprechenden PCR Produkten aus Legionella (16SrDNA) unter Verwendung des DIG RNA Labeling- Kit (SP6/T7) (Roche) oder des MAXIscript- Kits/Ambion) hergestellt.

[0019] Die Wirksamkeit der Oligonukleotide- Sonden wurde durch die Slot- Blot- Methode getestet. In vitro transkribierte 16SrRNA (Ribosomale RNA der kleinen Untereinheit der Bakterien-Ribosomen) wurde das Ziel-Molekül verwendet.

[0020] Die Slot- Blot- Hybridisierungen wurden entsprechend des Protokolls des DIG System User's guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim (1995) durchgeführt. 1000 fmol in vitro Transkribierter 16SrRNA verschiedener Legionella- Spezies wurden in RNA- Lösungs- Puffer (DEPC- HO, 20 × SSC), Formaldehyd (5:3:2) präpariert und für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Anschließend werden die Proben mittels eines Vakuum- Slot- Blotter-(Bio- Rad) auf eine positive geladene Nylon- Membran (Hybond- N) aufgebracht. Diese Membran war vor und nach dem Blotting mit 20 × SSC (3M NaCl und 300 mM Natriumcitrat pH 7,0) gewaschen worden. Anschließend wurden die Nukleinsäuren mit UV- Licht (für 2 Minuten) an die Membranen gebunden. Die Abkürzungen „M“ und „mM“ stehen für die Einheiten mol/l bzw. mmol/l.

[0021] Die Prä- Hybridisierung wurde in Hoch- SDS- Puffer (7% SDS, 50% Formaldehyd, 5 × SSC, 2% Blocking Reagent (Roche), 50 mM Natriumphosphat pH und 0,1 % Laurylsarcosin) für 2 Stunden bei Hybridisierung- Temperaturen durchgeführt. Danach erfolgte die Hybridisierung über Nacht in Hoch- SDS- Puffer mit 100 pmol DIG- markierter Oligonukleotid- Sonde bei 50–55°C abhängig von der Schmelztemperatur der Sonde. Die Proben wurden am 3'-Ende mit dem DIG Oligonukleotide 3'End

[0022] Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH) entsprechend des Protokolls des Herstellers mit Digoxigenin markiert.

[0023] Nach der Hybridisierung wurde die Membran zwei Mal mit 2 × SSC; 0,1 % SDS für 5 Minuten gewaschen, gefolgt von zweimaligem Waschen mit 0,1 × SSC; 0,1 % SDS, 0,2 × SSC; 0,1 % SDS oder 0,5 × SSC; 0,1 % SDS für 20 Minuten bei Hybridisierungstemperatur, um die ungebundene Sonde zu entfernen. Anschließend wurde die Membran in Maleinsäure-Puffer (0,1 M Maleinsäure und 0,15 M NaCl, pH 7,5) mit 0,3 % Tween 20™ für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindung der Alkalischen Phosphatase zu vermeiden. Die Membran wurde für 30 Minuten in Maleinsäure-Puffer mit 0,1% Blocking Lösung (Roche) inkubiert. Anschließend wurde die Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase (AP) 1 : 20 000 in Maleinsäure-Puffer mit 1% Blocking Lösung verdünnt und die Membran in der Antikörper-Lösung 30 Minuten inkubiert. Die Membran wurde 2 mal mit Maleinsäure-Puffer mit 0,3% Tween 20 für 15 Minuten gewaschen und für 5 Minuten in Nachweis-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5 und 100 mM NaCl) äquilibriert. Das als Substrat für die Alkalische Phosphatase benutzte CDP-Star™ Substrat (Roche) wurde 1:100 in Nachweis-Puffer verdünnt, auf die Oberfläche der Membran aufgetragen und in Plastik-Folie eingeschweißt für 10 Minuten inkubiert. Die Membran wurde exponiert (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Zeitraum war zuerst 1 Stunde und später 10 oder 5 Minuten um die Färbung des Hintergrundes zu reduzieren.

[0024] Die Ergebnisse der Slot-Blot-Test's zeigen folgendes.

1. Sonden zum Nachweis der Gattung Legionella

Die Sonde Legall 11 hybridisierte mit der in vitro transkribierten 16SrRNA aller untersuchten Legionella Spezies (15 Arten – siehe Tabelle 2, S.8). Die Bindung war spezifisch für alle Legionella- Spezies.

Die Sonde Legall 22 hybridisierte ebenfalls spezifisch mit der in vitro transkribierten 16SrRNA aller untersuchten Legionella- Spezies.

Beide Sonden sind für einen Nachweis der Gattung Legionella im Sandwich-Hybridisierungsnachweis mit Legall 11 als Fängersonde und Legall 22 als Nachweissonde geeignet. Die Hybridisierungstemperatur war 50°C.

2. Sonden zum Nachweis von Legionella pneumophila Die Sonde Legpneu 1 hybridisierte mit der in vitro transkribierten 16S rRNA der Legionella pneumophila Serogruppe 1 ATCC33152, Legionella pneumophila Serogruppe 6, Legionella pneumophila Philadelphia I JR32 WT und mit Legionella micdadei.

Die Sonde Legpneu 2 hybridisiert mit in vitro transkribierter 16S rRNA von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 ATCC33152, *Legionella pneumophila* Serogruppe 6 und *Legionella pneumophila* Philadelphia I JR32 WT. Diese Sonde ist hochspezifisch und kann als Fänger-Sonde mit der Legpneu1-Sonde in Sandwich-Hybridisierungs-Nachweisen verwendet werden. Die Hybridisierungstemperatur war 50°C.

3. Sonden zum Nachweis von *Legionella feeleei*

Die Sonde Legfeel 1 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von *Legionella feeleei* und ist spezifisch. Sie kann als Fänger-Sonde zusammen mit Leggfeel 2 zum Nachweis von *Legionella feeleei* benutzt werden.

Die Sonde Legfeel 2 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von *Legionella feeleei* und ist spezifisch. Sie kann als Nachweis-Sonde verwendet werden, weil sie eine niedrige Bindungseffizienz besitzt als die Sonde Legfeel 1.

Diese beiden Legfeel-Sonden können zum Nachweis von *Legionella feeleei* in Sandwich-Hybridisierungs-Ansätzen verwendet werden. Die spezifische Hybridisierungstemperatur beider Sonden war 55°C.

4. Sonden zum Nachweis von *Legionella jordanis*

Die Sonde Legjor 2 hybridisierte mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von *Legionella jordanis* und *Legionella feeleei*. Die Bindung mit der *Legionella jordanis*-Probe war spezifisch und die Bindung mit der *Legionella feeleei*-Probe war unspezifisch. Diese Sonde kann als Nachweis-Sonde zusammen mit der Legjor1-Sonde verwendet werden.

Die Sonde Legjor 1 hybridisierte nur mit der in vitro transkribierten 16S rRNA von *Legionella jordanis*. Die Bindung dieser Sonde zum Zielmolekül war spezifisch. Die Sonde kann als Fänger-Sonde zusammen mit der Sonde Legjor 2 verwendet werden. Die Hybridisierungstemperatur für beide Sonden war ebenfalls 55°C.

[0025] Die Vorteile der Erfindung bestehen darin, daß die neuen Oligonukleotide gattungs- und artspezifisch für die Sandwich-Hybridisierungsmethode besonders geeignet sind. Vorteilhaft wirkt sich weiter der Einsatz von Kombinationen der neuen Oligonukleotide aus. Möglich sind auch Kombinationen mit anderen Oligonukleotid-Sonden z.B. für den Einsatz als Primer für PCR, fluoreszenzmarkiert für mikroskopische Nachweise, zur Fluoreszenzsandwichhybridisierung und zur Sandwich-Hybridisierung mit elektrischer Signalauslesung.

Tabelle 2 : Untersuchte Legionella Spezies

Legionella Spezies	SONDEN							
	Legall11	Legall22	Legpneu1	Legpneu2	Legfeel1	Legfeel2	Legjor2	Legjor1
L. bozemanii	0	0						
L. dumoffii	0	0						
L. erythra	0	0						
L. feeleyi	0	0			0	0	2	
L. gormanii	0	0						
L. hackeliae	0	0						
L. israelensis	0	0						
L. jordanis	0	0					0	0
L. longbeachae	0	0						
L. micdadei	0	0	1					
L. oakridgensis	0	0						
L.p. 1 ATCC 33152	0	0	0	0				
L.p. gorby WT	0	0						
L.p.philadelphia JR32 WT	0	0	0	0				
L.p.philadelphia serogr. 6	0	0	0	0				
Hybridisierungstemp.	50	50	50	50	55	55	55	55
Waschpuffer	A	A	B	B	A	A	A	A

Sequenzprotokoll

<110> Breitenstein, Antje

<120> Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung Legionella

<140> 103 38 123.6

<141> 15.08. 2003

<160> 8

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> ttgcgcgccc tctgtatcg

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Legionella pneumophila

<400> atctgacogt cccaggtt

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Legionella feelei

<400> gcgccactaa cctcattcat

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Legionella feelei

<400> tatacaacca cctacgcacc

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> *Legionella jordanis*

<400> cttacggtcc ccagctttt

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> *Legionella jordanis*

<400> ccactcctcc ccactgaaag

<210> 7
<211> 19
<212> DNA
<213> *Legionella* sp.

<400> cctcctcccc actgaaagt

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> *Legionella* sp.

<400> cactgtatgt caagggtagg

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis von Bakterien der Gattung *Legionella* mittels der Sandwich- Hybridisierungs-Methode **dadurch gekennzeichnet**, dass

a) gattungsspezifisch zum Nachweis der Gattung *Legionella* als Fängersonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCTCCTCCCCACTGAAAGT-3' und als Nachweissonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CACTGTATGT-CAAGGGTAGG,

b) artspezifisch zum Nachweis von *Legionella pneumophila* als Fänger- Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-ATCTGACCGTCCCAGGTT-3' und als Nachweis- Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TCGCCGC-CCTCTGTATCG-3';

e) artspezifisch zum Nachweis von *Legionella feeleii* als Fänger- Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-GCGCCACTAACCTCATTCAT-3' und als Nachweis- Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-TATACAAC-CACCTACGCACC-3' und

d) artspezifisch zum Nachweis von *Legionella jordanis* als Fänger- Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CCATCCTCCCCACTGAAAG-3' und als Nachweis- Sonde ein Oligonukleotid der Sequenz 5'-CT-TACGGTCCCCAGCTTTTT-3';

verwendet werden und die Hybridisierung bei Temperaturen von 50–55° C erfolgt.

2. Verfahren gemäß Patentanspruch 1, gekennzeichnet dadurch, dass bei artspezifischen Nachweisen von *Legionella* Spezies die Oligonukleotide für die Fänger- Sonden und Nachweis- Sonden gegeneinander austauschbar sind.

3. Verfahren gemäß Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Nachweise mit Kombinationen von Oligonukleotiden für gattungsspezifische Sonden und Oligonukleotiden für artspezifische Sonden vorgenommen werden.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

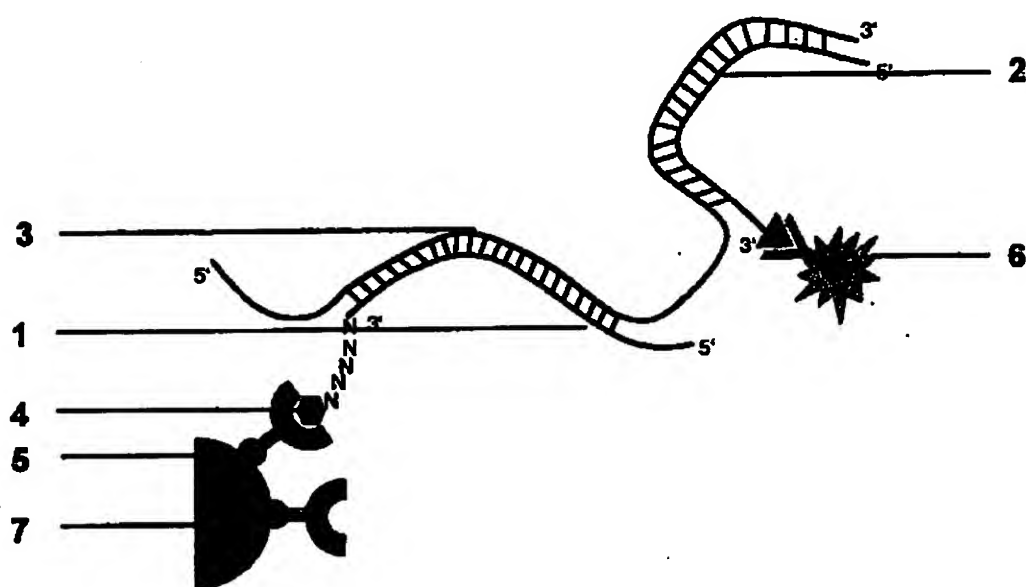


Fig. 1